

# Studies on the [beta]-1, 3-glucanase system of streptomyces and its application

著者	Kusama Satoru
内容記述	Thesis--University of Tsukuba, D.Agr.(A), no. 408, 1987. 2. 28
発行年	1987
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/3731">http://hdl.handle.net/2241/3731</a>

## 【 5 】

氏 名 (本 籍)	草 間	悟	(新潟県)
学 位 の 種 類	農 学 博 士		
学 位 記 番 号	博 甲 第 4 0 8 号		
学 位 授 与 年 月 日	昭 和 62 年 2 月 28 日		
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当		
審 査 研 究 科	農学研究科		
学 位 論 文 題 目	Studies on the $\beta$ -1,3-Glucanase System of <i>Streptomyces</i> and its Application (放線菌の $\beta$ -1,3-グルカナーゼ系とその応用に関する研究)		
主 査	筑波大学教授	農学博士	村 上 和 雄
副 査	筑波大学教授	農学博士	安 井 恒 男
副 査	筑波大学助教授	農学博士	日 下 部 功
副 査	筑波大学教授	農学博士	鈴 木 怒
副 査	筑波大学教授	農学博士	新 井 勇 治

## 論 文 の 要 旨

生物界における多糖類は多種多様であり、多糖類と生命現象との関連も次第に明らかにされつつある。一方、多糖類に関連する酵素も多種多様であり、それらの酵素は、医薬品、食品工業、その他の産業に利用されているが、さらに新しい多糖類とそれらに関連する酵素の発見及びそれらの応用の展開が期待されている。

このような状況において、本研究では、最近市販された、微生物の生産する $\beta$ -1,3-グルカンであるカードランに着目し、この多糖を酵素的に利用する目的で、カードランを分解する放線菌を見出し、生産される酵素の性質を調べるとともにその応用を試みている。本研究の内容は以下のような項目にまとめられる。

- ① カードラン分解酵素を生産する放線菌の分離とカードラン分解酵素の性質の解明
- ② 酵素系によるカードランからのラミニナリオースとゲンチオビオースの調製
- ③  $\beta$ -1,3-グルカナーゼと $\beta$ -グルコシダーゼの分離及び両酵素によるカードランからのゲンチオビオース生成機構の解明
- ④ 酵素系によるステビオシドへのグルコース付加と糖付加物の構造の解明

#### ① カードラン分解酵素を生産する放線菌の分離とカードラン分解酵素の性質の解明

カードランを炭素源に用いて土壌からカードランを分解する微生物を探索した結果、約20株の放線菌を取得することができた。得られた菌株の菌体外酵素によるカードラン分解の終産物は、グルコースとラミナリビオースである一群（酵素系Ⅰ）と、グルコースとゲンチオビオースである一群（酵素系Ⅱ）とに大別できた。いずれも約10株ずつ取得できたことから、これらの性質を有する放線菌は自然界に広く分布するものと思われる。

#### ② 酵素系Ⅰ、Ⅱによるカードランからのラミナリビオースとゲンチオビオースの調製

酵素系Ⅰ（代表株K27-4）の至適条件（pH5.8, 55℃, 24時間）でカードランを分解させた結果、グルコースとラミナリビオースが重量比でほぼ1：1に生成した。その水解液に栄養源を加え、ラミナリビオース非資化性酵母を生育させ、グルコースを完全に資化させた。この糖液を精製濃縮し、カードラン100gから結晶ラミナリビオース31gを得ることができた。一方、酵素系Ⅱ（代表株W19-1）により、ゲンチオビオース生成の至適条件（pH6.0, 50℃, 24時間）でカードランを分解させた結果、グルコースとゲンチオビオースが重量比でほぼ4：1に生成した。この水解糖液を炭末カラムクロマトグラフィーにより分離し、結晶ゲンチオビオースを得ることができた。反応系にあらかじめグルコースを添加するとゲンチオビオース生成量が増加し、カードラン50gとグルコース100gから結晶ゲンチオビオース14.7gが取得できた。

本法によるラミナリビオースとゲンチオビオースの製造法は工業的な面で評価され、現在試作品が市販されつつある。また、このような酵素系Ⅰ、Ⅱによるラミナリビオース、ゲンチオビオースの生成機構は、糖質関連酵素全般に適用できる可能性を示唆している。

#### ③ $\beta$ -1,3-グルカナーゼと $\beta$ -グルコシダーゼの分離及び両酵素によるカードランからのゲンチオビオース生成機構の解明

酵素系Ⅱの作用で、 $\beta$ -1,3-グルカンであるカードランから $\beta$ -1,6-グルコビオースであるゲンチオビオースの生成機構に特に興味が注がれ、これを明らかにする目的でゲンチオビオース生成に関与する酵素の分離を行なった。その結果、酵素系Ⅱは、80%飽和の硫酸分画後、ハイドロキシルアパタイトカラムにより、 $\beta$ -1,3-グルカナーゼと $\beta$ -グルコシダーゼに効率よく分離された。 $\beta$ -1,3-グルカナーゼはカードランを分解し、反応初期ではラミナリオリゴ糖を生成するが、反応末期ではグルコースとラミナリビオースになった。一方、 $\beta$ -グルコシダーゼはラミナリビオースによく作用し、グルコースとゲンチオビオースを生成した。またこの酵素は、ラミナリトリオース、ラミナリテトラオースにも作用し、反応初期では種々の生成物がみられるが、最終的にはグルコースとゲンチオビオースが主産物であった。以上のことから、酵素系Ⅱによるカードランからのゲンチオビオースの生成には、 $\beta$ -1,3-グルカナーゼと $\beta$ -グルコシダーゼの両酵素が必須で、両酵素の共同作用でゲンチオビオースが生成することが明らかとなった。

#### ④ 酵素系によるステビオシドへのグルコース付加と糖付加物の構造の解明

ステビオシドは南米パラグアイ原産のステビアと呼ばれるキク科植物の葉に含まれる甘味成分

の一つで、甘味度が砂糖の約150倍であり、近年、砂糖の代替甘味料として使用されている。しかしこれは若干の苦味を呈することが欠点とされており、ステビオシドに $\beta$ -1,3結合でグルコースが1個付加しているレバウディオシドAは、ステビオシドより甘味度・味質ともに優れていると言われている。最近、構造と甘味の関係に興味を持たれ、グルコシルトランスフェラーゼによるステビア抽出物の甘味改良の開発研究がなされている。しかし、これまで $\beta$ 結合で糖を付加した報告例はなく、またレバウディオシドAを生合成するという期待もあって、酵素系Ⅱによるステビオシドへの糖付加物の生成を試みた。その結果、酵素系Ⅱによりカードランとステビオシドから糖付加物が生成することを発見した。糖付加物の生成条件は、カードラン10%、ステビオシド30%、pH6.0、55℃、30分反応が適しており、また酵素濃度を高めることによって糖付加物の生成量も増加した（転移率30%）。

次にこれらの主要な糖付加物の分離とその構造研究を行った。すなわち、上述の条件で生成した糖付加物混合液から、非極性多孔性樹脂HP-20カラム、TOYOPEARL HW-40Fによるゲル汙過、次いでTSKgelNH<sub>2</sub>-60による分取用高速液クロにより、糖付加物A、B及びCを単離した。糖付加物の構造は、メチル化分析、酸分解、アルカリ分解、酵素法及び旋光度測定法によって同定した。その結果、糖付加物Aは13-O- $\beta$ -ソホロシル-19-O- $\beta$ -ラミナリビオシルステビオール;Bは13-O- $\beta$ -(3- $\beta$ -グルコシルソホロシル)-19-O- $\beta$ -グルコシルステビオール;Cは13-O- $\beta$ -ソホロシル-19-O- $\beta$ -ラミナリトリオシルステビオール、であった。これらの構造はMS及び<sup>13</sup>C-NMRでも支持されるものであった。糖付加物A、Bはステビオシドに $\beta$ -1,3結合でグルコースが1個、糖付加物C $\beta$ -1,3結合でグルコースが2個付加したものであり、いずれも天然には存在しない新規物質であった。このような甘味配糖体への糖付加は相対甘味度を若干低下させたものの苦味は改善されており、新規甘味源の開発につながっている。

この論文は、カードランからのラミナリビオースとゲンチオビオース調製の実用的な実験データを示している点、また、ステビオシドへの糖付加が新規甘味源の開発につながっている点等が特徴になっている。以上の内容は、糖質化学及び多糖類分解酵素全般に新たな知見を加えるものと思われる。

## 審 査 の 要 旨

放線菌の $\beta$ -1,3-グルカナーゼと $\beta$ -グルコシダーゼについての報告は数少ない。本論文は、最近市販された $\beta$ -1,3-グルカンであるカードランに着目し、この多糖を分解する菌体外酵素生産性の放線菌を発見し、それら酵素の諸性質の解明と利用をおこなったものである。カードランからのラミナリビオースとゲンチオビオースの新しい製造方法は工業的な面で評価され（特許申請中）、現在、産学共同によって工業化研究がおこなわれている。一方、それらの酵素による上記

の糖類の生成メカニズムの解明は、糖質関連酵素全般に深い知見を与えた点で評価できる。またステビオシドへの糖付加は、新規甘味物質の製造・開発につながっており、興味深い研究となっている。

よって、著者は農学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。